Aus der Abteilung für Zahnerhaltung
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. P. Riethe
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Universität Tübingen

Die intradermale Injektion bei Kaninchen als Methode der biologischen Werkstoffprüfung zahnärztlicher Kunststoffe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt
von
Otto Unger
aus
Solnhofen/Mfr.

1979

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. P. Riethe
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Universität Tübingen

Die intradermale Injektion bei Kaninchen als Methode der biologischen Werkstoffprüfung zahnärztlicher Kunststoffe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt
von
Otto Unger
aus
Solnhofen/Mfr.

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. N. Schwenzer

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. W. T. Klötzer
(Professor Dr. Dr. P. Riethe)

Meiner Frau

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	4
II.	LITERATUR	6
2.1.	Gewebsreaktionen auf zahnärztliche Kunststoffe	6
2.2.	Entwicklung biologischer Prüfnormen	7
2.3.	Biologische Materialprüfung - Kenngrößen	9
2.4.	Prüfung der akuten lokalen Toxizität	10
2.5.	Intradermaltest bei Kaninchen	11
2.6.	Weitere Methoden der biologischen Materialprüfung	14
III.	MATERIAL UND METHODE	17
3.1.	Versuchsmaterial	17
3.1.3.	Extraktionsgeräte	20
3.1.4.	Extraktionslösungen	21
3.1.5.	Aufbereitung der Extraktionen nach Anwendung von Äthylalkohol	21
3.2.	Intradermaler Test nach Trypanblau-Methode	22
3.2.1.	Bewertung der Reaktion	23
3.3.	Eigene Versuche	24
3.4.	Angewandte Extraktionsverfahren	26
3,5,	Dokumentation der Versuche	28

IV. ERGEBNISSE 31

4.1. Ergebnisse der intradermalen Injektionen 31

4.2. Bewertung der Reaktionen 32

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 35

5.1. Extraktionsverfahren 36

5.2. Versuchtiere und Vorbereitung zum Test 37

5.3. Intradermaler Test 38

5.4. Eignung des Testverfahrens zur Prüfung zahnärztlicher Materialien 38

VI. ZUSAMMENFASSUNG 40

LITERATURVERZEICHNIS 43

I. EINLEITUNG

Die Entwicklung zahnärztlicher Kunststoffe hat in den vergangenen Jahren einen enormen Aufschwung erlebt. Die Dentalindustrie bietet heute hochwertige Kunststoffe für den restaurativen und prothetischen Bereich der Zahnheilkunde an.
Bedingt durch nationale und internationale Prüfnormen konnte eine Qualitätszunahme der Kunststoffe erreicht werden. Diese Normierungen betreffen jedoch nur die physikalischen, chemischen und mechanischen Eigenschaften zahnärztlicher Kunststoffe.
Diese Werkstoffe stehen aber auch in ständigem Kontakt mit verschiedenen lebenden Geweben, bei denen im Falle einer Unverträglichkeit verschiedene Reiz- und Entzündungsreaktionen ausgelöst werden.
Zur Bestimmung der biologischen Eigenschaften von zahnärztlichen Werkstoffen sind brauchbare biologische Prüfmethoden für eine große Zahl von Materialien und für verschiedene Verwendungszwecke erarbeitet worden, deren Normierung bzw. Standardisierung von nationalen und internationalen Einrichtungen bestrebt wird.
Zur Prüfung der biologischen Eigenschaften der zahnärztlichen Kunststoffe sind noch keine Prüf-

normen vorgeschrieben. In den USA wird seit 1972 tentativ eine biologische Prüfnorm angewandt. Die Gremien*, die sich mit der Entwicklung genormter biologischer Materialprüfung befassen, gehen von den folgenden Teststufen aus:

1. Toxizitäts- und Eliminationstests
2. Anwendungstests
3. Klinische Erprobung

Das in dieser Arbeit untersuchte Testverfahren gehört der ersten Teststufe an. Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, ob die Prüfmethode im Rahmen der biologischen Materialprüfung für zahnärztliche Werkstoffe geeignet ist. Bei diesem Testverfahren werden Extraktionen zahnärztlicher Kunststoffe Kaninchen intradermal in die Rückenhaut injiziert und auftretende Irritationen bewertet.

*Arbeitsausschüsse der 'American Dental Association' (ADA), der 'Federation Dentaire Internationale' (FDI), des'Fachnormenausschusses Dental' im Deutschen Normenausschuß und dessen Dachverband, die 'International Organisation for Standardisation' (ISO), in Zusammenarbeit mit der 'World Health Organisation' (WHO)-

II. LITERATUR

2.1. Gewebsreaktionen auf zahnärztliche Kunststoffe können weitgehend voneinander unabhängige Reaktionen auslösen, die von Art und Resistenz des Gewebes oder Organs, auf das sie einwirken, abhängig sind (18). Reaktionen der Gingiva bei Verwendung von Kunststoffen für prothetische und konservierende Maßnahmen sind bekannt (9, 15, 19). Diese Reaktionen werden auf chemotoxische, allergische oder evtl. auch auf die das Bakterienwachstum stimulierenden Eigenschaften der Kunststoffe zurückgeführt (12,28).

Vorraussetzung für eine chemisch-toxische Reizwirkung ist, daß sich ein oder mehrere Bestandteile des Materials lösen oder ausgelaugt werden. (3,5,14,15)

Als auslösende chemische Faktoren werden das Monomer, Pigmentfarbstoffe, sowie eine große Zahl von Stabilisatoren und Weichmacher genannt (3,5,7,9, 10,11,19,31).

Heißhärtenden Polymethylmethacrylaten wird, wie den Polycarbonaten, nur eine geringe oder keine chemisch-toxische Reizwirkung nachgesagt (5,12,25,35). Während andere Kunststoffmaterialien, vor allem kalthärtendes Polymethylmethacrylat, zytotoxische Wirkung zeigen (11,12,35).

2.2. Entwicklung biologischer Prüfnormen

Die Grundprinzipien, die bei der Toxizitätsprüfung chemischer Substanzen angewendet werden, sind auf die Prüfung zahnärztlicher Werkstoffe ebenfalls anwendbar. Da es sich bei diesen Materialien aber vor allem um feste Stoffe handelt, ist ein anderes toxikologisches Untersuchungskonzept erforderlich (14), wobei die zu untersuchende Materialprobe oder Substanz in Kontakt mit lebendem Gewebe gebracht werden muß, und eine auftretende Reaktion untersucht und beschrieben werden muß.

Eine auftretende biologische Reaktion beruht vor allem darauf, daß ein oder mehrere Bestandteile eines Materials ausgelaugt oder gelöst werden, und in Kontakt mit lebendem Gewebe treten (3,5,14,15). Die Identität der, aus dem Material auslaugbaren Stoffe, muß ermittelt werden, um genaue toxikologische Informationen über diese Stoffe zu erhalten (1,13,14).

Die Entwicklung biologischer Testverfahren zur Prüfung zahnärztlicher Materialien hat lange auf sich warten lassen (22). Bisher liegen FDI-Spezifikationen nur für chemische, physikalische und mechanische Eigenschaften zahnärztlicher

Werkstoffe vor (34). Erst 1965 wurden in den USA gesetzliche Bestimmungen über biologische Prüfverfahren erlassen (2,4,32,33). Darauf beruhen die Vorschläge zur Prüfung zahnärztlicher Materialien der ADA (1), um als Grundlage für eine internationale Standardisierung zu dienen (3).

Prüfnormen für biologische Eigenschaften zahnärztlicher Werkstoffe aufzustellen, ist, gegenüber physikalischen Normen, mit besonderen Schwierigkeiten belastet, da die Variablen im biologischen Experiment nicht nur zahlreicher, sondern auf schwerer kontrollierbar und objektivierbar sind (22).
Deshalb sind genaue Bestimmungen toxikologischer Eigenschaften auch nur in Serie von Tests möglich (4).
Die Forderung nach biologischen Prüfungen zahnärztlicher Materialien besteht auch in Deutschland seit vielen Jahren, und wurde in den letzten Jahren verstärkt erhoben (5,6,7,9,14,15,16,18,22). Diese Forderung ist umso berechtigter, da Kunststoffe im zunehmenden Maße Grundmaterialien der prothetischen und konservierenden Behandlung geworden sind, und somit in erhöhtem Maße mit der Mundschleimhaut in Kontakt gebracht werden (2,3,23). Die Erstellung biologischer Prüfnormen sollte

sich auf brauchbare, einfache Tests beschränken, die in jedem Labor reproduzierbar sind und von Wirtschaftlichkeit geprägt sein sollen (29). Ziel dieser Prüfnormen ist es, den Patienten vor Schäden zu bewahren, die durch unerkannte toxische Komponenten zahnärztlicher Materialien ausgelöst werden könnten.

2.3. Biologische Materialprüfung - Kenngrößen

Die Wirkung zahnärztlicher Materialien kann weder in einfachen Toxizitätstests noch in rein klinischer Erprobung genügend ermittelt werden (14). Daher wird die biologische Prüfung zahnärztlicher Materialien von KLÖTZER (15) grundsätzlich in drei aufeinanderfolgenden Stufen gefordert:

1. Toxizitäts- und Eliminationstests
2. Anwendungstests
3. Klinische Erprobung

Ähnliche Teststufen sind beschrieben (1.5.14.18.20, 29,33).

Jeder dieser Stufen kommt je nach Material und vorgesehener zahnärztlicher Verwendung eine unterschiedliche Bedeutung zu.

Im Rahmen der Toxizitäts- und Eliminationstests sind folgende biologische Kenngrößen von Bedeu-

tung und ermöglichen, das Toxizitätsprofil des untersuchten Materials zur erkennen (14,15,18,21, 22,29).

a. akute allgemeine (resorptive) Toxizität (LD-50-Methode)
b. akute lokale Toxizität bei unspezifischer Anwendung des Materials (Implantationstest, Zellkultur, sowie intradermaler Test)
c. allergisierendes Potential (Maximierungstest nach MAGNUSSON und KLIGMAN (26))
d. Tumorgenese

Zu den einzelnen Kenngrößen sind Prüfverfahren beschrieben worden (1,18,20,22,23,26,33).

2.4. Prüfung der akuten lokalen Toxizität zahnärztlicher Kunststoffe

Der Ermittlung der akuten chemisch-toxischen Wirkung von zahnärztlichen Kunststoffen kommt eine große Bedeutung zu, wenn auch die Aussagekraft der Tests durch die unspezifische Anwendung des Materials begrenzt ist (18).
Als Testverfahren der akuten lokalen Toxizität werden der Implantationstest in die Kaninchen-

muskulatur, der Zellkulturtest und der Intradermaltest bei Kaninchen zur Verfahrensprüfung und evtl. Standardisierung vorgeschlagen (1,3).

2.5. Der Intradermaltest bei Kaninchen

Diese Methode dient zur Prüfung flüssiger Substanzen oder von Substanzen, von denen sich Lösungen oder Extrakte herstellen lassen (18,32). Bei der Verwendung von Extrakten fester Substanzen gliedert sich der Test in

2.5.1. Intradermaltest
2.5.2. Extraktionsverfahren

ad 2.5.1. Die angegebenen Methoden (3,4,29,32) unterscheiden sich in der Anzahl der Injektionen pro Tier, der Anzahl der zu verwendenden Versuchstiere pro Material, sowie in der Auswertung der Reaktionen.
Zwei Testverfahren sind zu unterscheiden:

a. US-Pharmacopeia-Test (4,32)
Intradermale Injektionen von 0,2 ml Testsubstanz an 10 Stellen bei zwei Kaninchen. An Stellen Injektion der korrespondierenden Leerprobe. Kontrolle nach 24, 48 und 72 Stunden. Auswertung nach Erythem, Ödem und Nekrose.

b. Trypanblau-Methode (4,29,18)

Intradermale Injektion von 0,2 ml Testflüssigkeit an 2 oder mehr Stellen bei Kaninchen. Als negative Kontrolle dient physiologische Kochsalzlösung und als positive Kontrolle 20%iger Äthylalkohol; die Kontrollsubstanzen werden in gleicher Weise und Menge intradermal injiziert. 15 Minuten nach letzter Injektion erfolgt die Injektion einer 1%igen Trypanblau-Lösung in die marginale Ohrvene. Kontrolle der Testinjektionen nach 30 Sekunden, 1, 5, 10, 15, 30, 45 und 60 Minuten nach Trypanblau-Injektion.
Eine weitere Kontrolle der Tiere schließt sich nach 24 Stunden an.
Durch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität im Bereich der Injektionsstellen, zeigt der Grad der Färbung und die Größe der Zone der Färbung die Antwort auf eine lokale Gewebsirritation.

ad 2.5.2. Ausgehend von der Voraussetzung einer chemisch-toxischen Reizwirkung der Kunststoffe, nämlich die Auslaugbarkeit oder Löslichkeit eines oder mehrerer seiner Bestandteile, hat zur Entwicklung verschiedener Extraktionsverfahren geführt (3,4,10,18,32).

Die Herstellung von Extrakten aus Kunststoffen setzt sich zusammen aus:

2.5.2.1. Extraktionsmethode

2.5.2.2. Extraktionslösung

2.5.2.3. Aufbereitungslösung zur Injektion

ad 2.5.2.1. Angegebene Methoden sind die Extraktion im Autoklaven bei 121°C über eine Stunde (3,4,18,32); im Wärmeschrank bei 50°C über 72 Stunden und bei 70°C über 24 Stunden (4,18,32) oder in der Soxhlet-Apparatur über 24 Stunden (3,10,18).

ad 2.5.2.2. die Lösungsmittel der Extraktionen unterliegen verschiedener Beurteilung. Die US-Pharmacopeia (32) empfiehlt

1. physiologische Kochsalzlösung
2. 1:20 einer lösung von Alkohol in physiologischer Kochsalzlösung
3. Polyäthylenglykol 400
4. Pflanzenöl, wie Sesam- oder Baumwollsamenöl

AUTIAN (3) hatte mit Wasser und 95% Äthylalkohol als Lösungsmittel zufriedenstellende Ergebnisse. Während GUESS et al (10) vor der Verwendung von Alkohol als Lösungsmittel warnt, da er ein eigenes toxisches Potential aufweist. Nach AUTIAN (4) sei durch Verdampfen des Restalkohols und Ölaufbereitung des Restbestandes eine mögliche Irritation durch Alkohol genommen.
AUTIAN (4) stellte fest, daß die 1:20 Lösung von Alkohol in physiologischer Kochsalzlösung keinen Unterschied in der Reaktion gegenüber reiner physiologischer Kochsalzlösung aufzeigt. Bei der Ver-

wendung von Polyäthylenglykol 400 zeigte die Leerprobe in seinen Versuchen die gleiche Reaktion wie der Extrakt, sodaß er von der Verwendung beider Lösungsmittel absieht.

ad 2.5.2.3. Nach Extraktion im Soxhlet-Apparat, in dem 95% Äthylalkohol als Lösungsmittel Verwendung findet, ist eine Aufbereitung des Extraktes nach Verdampfen des Alkohols notwendig.
AUTIAN (4) verwendet Kochsalzlösung oder Pflanzenöl, während GUESS et al. (10) 0,5% Na-Carboxymethylcellulose in physiologischer Kochsalzlösung anwendet.

2.5.3. Bewertung der Reaktion
Während die US-Pharmacopeia (32) eine Bewertung der Reaktion mit den Stufen Erythem, Ödem und Nekrose angibt, werden bei der Trypanblau-Methode (4, 18, 29) differenzierte Angaben zur Bewertung der Injektionsreaktionen gemacht, die sich nach dem Grad und der Größe der Zone der Färbung richten.

2.6. Weitere Methoden der biologischen Materialprüfung
Wie unter 2.4. aufgeführt, sind noch andere Methoden biologischer Werkstoffprüfung zur Verfah-

rensprüfung vorgeschlagen worden, die der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollen.

2.6.1. Implantationstest in Kaninchenmuskulatur

Die Materialproben werden in die paravertebrale Muskulatur von Kaninchen mit Hilfe einer Injektionskanüle implantiert. Nach siebentägiger Beobachtungszeit werden die Versuchstiere getötet; die Reaktion wird makroskopisch beurteilt, und Proben zur histologischen Untersuchung werden entnommen [2,3,4,18,29,32,33].

2.6.2. Konjunktivaltest bei Kaninchen

In den Konjunktivalsack von Kaninchen werden Extrakte der zu prüfenden Werkstoffe eingeträufelt. Auftretende Konjunktivitis ist ein Zeichen toxischer Gewebsirritation [29].

2.6.3. Zellkulturtest

Je nach Toxizität des Prüfmaterials wird durch die, auf der Zellkultur befindliche Materialprobe, im Brutschrank Zellyse in einem bestimmten Radius hervorgerufen. GUESS und AUTIAN bringen auf die Kultur eine dünne Schicht gefärbten Agars. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C ist eine auftretende toxische Reaktion am Agar erkennbar [3,4,5,18,29].

2.6.4. Epidermaltest

Materialproben werden auf der Kaninchenhaut befestigt. Nach entsprechender Beobachtungszeit wird eine auftretende Hautreaktion beurteilt (29).

2.6.5. Allergietest

Das allergisierende Potential eines Materials läßt sich im "Maximierungstest" mit Meerschweinchen, wie er von MAGNUSSON und KLIGMAN (26) 1969 beschrieben wurde, bestimmen.

2.6.6. Anwendungstests

Hierbei soll die vorgesehene zahnärztliche Verwendung der Materialien weitmöglichst nachgeahmt werden. KLÖTZER (12,15) führte hierzu Pulpenirritationstests, Gingiva-Kontakt-Tests und Gaumenschleimhaut-Tests bei Primaten durch.

III. MATERIAL UND METHODE

In die Rückenhaut von Kaninchen werden Extrakte der zu prüfenden Materialien intradermal injiziert. Nach erfolgter intravenöser Injektion einer 1%igen Trypanblaulösung werden die Injektionsquaddeln beobachtet und auftretende Gewebsreaktionen bewertet.
Diese Methode der biologischen Materialprüfung ist in der United States Pharmacopeia enthalten und wurde von AUTIAN u.a. beschrieben.
Sie eignet sich zur Ermittlung der primären Irritation zahnärztlicher Materialien und deren Komponenten, sofern es sich um Flüssigkeiten handelt oder um Materialien, von denen sich Lösungen oder Suspensionen herstellen lassen. Auch können Extrakte der Materialien mittels dieser Methode geprüft werden.

3.1. Versuchsmaterial

Für die Herstellung flüssiger Extrakte wurden zahnärztliche Kunststoffe aus allen Verwendungsbereichen herangezogen. Spezielle Kriterien für die Auswahl der untersuchten Erzeugnisse bestanden nicht.
Es handelt sich bei zehn Prüfmaterialien um heiß- oder autopolymerisierende Kunststoffe auf Methylmethacrylat-Copolymer-Basis. Ein glasfaserverstärktes

Polycarbonat, sowie eine zur Verfügung gestellte Materialprobe[x] mit bekannt toxischem Potential wurden untersucht (s. Tabelle 1).

Material Code-Nr.	Handelsname	Hersteller
K 5	Biodent K B 75	De Trey GmbH, Wiesbaden
K 9	Palacast	Kulzer, Bad Homburg v.d H.
K 14	Palpress	" "
K 18	Paladur	" "
K 21	Formatray	Kerr, Karlsruhe
K 23	Orthocryl	Dentaurum, Pforzheim
K 24	Orthocryl-Rapid	" "
K 25	Crylan	" "
K 26	Crylan-Rapid	" "
K 27	Palamed	Kulzer, Bad Homburg v.d.H.
K 30	Andoran	Bayer, Leverkusen
K tox	-------	Toxisches PVC

Tabelle 1 : Versuchsmaterialien

[x]bekannt toxisches Material (PVC) verwendet

3.1.1. Zubereitung der Materialien

Die Polamerisation der heiß- und kalthärtenden Kunststoffe erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Um vergleichbare Voraussetzungen für alle Prüfmaterialien zu schaffen, erfolgte die Herstellung 1 bis 2 Stunden vor der Verwendung als Extraktionsmaterial.

Nach erfolgter Polymerisation wurde der Kunststoff in ca. 1x2x4 mm große Stücke zersägt. Später ersetzte die Verwendung einer waffelartigen Gummimatrize mit der Waffelgröße 1x2x3 mm zur Herstellung der Prüfkörper das manuelle Zerkleinern, schloß aber eine Nachbearbeitung der Kunststoffwürfel nicht aus. Durch die relativ geringe Größe der Materialprobestücke ist eine große Oberfläche gewährleistet, auf die ein Lösungsmittel einwirken kann.

Das Prüfmaterial wurde vor Weiterverwendung auf eventuelle Unsauberkeiten überprüft.

Die toxische Prüfsubstanz wurde in Rollenform mit einer Strangstärke von 1,5 mm geliefert, die als 3 mm lange Stücke geprüft wurden.

Der Polycarbonat-Kunststoff wurde in gelieferter Granulatform und -größe, jeweils kurz vor dem Versuch aus einer Vakuum-Ampulle entnommen, um eine evtl. Feuchtigkeitsaufnahme oder Verunreinigung zu verhindern.

3.1.2. Menge des Prüfmaterials

Für jeden Extraktionsvorgang wurden 5,0g des jeweiligen Kunststoffes benötigt. Um ein konstantes Verhältnis Kunststoff : Extraktionslösung von 1 : 3 beizubehalten, wurde von jeder Lösung 15 ml verwendet. In der Soxhlet-Apparatur wurden gerätebedingt 60 ml Lösung angesetzt.

3.1.3. Extraktionsgeräte

Die Extraktionen wurden im Soxhlet-Apparat, Wärmeschrank, Autoklaven und einer Destillationsanordnung durchgeführt. Die Prüfmaterialien wurden thermischen und chemischen Belastungen ausgesetzt.

3.1.3.1. Soxhlet-Apparatur
Es wurde ein handelsübliches Gerät mit einem 100 ml-Rundkolben verwendet, der mit einem elektrischen, zweistufig regulierbarem Heizkissen versehen war.
Das Extraktionsvolumen betrug 30 ml. Es wurden Extraktionshülsen der Größe 22 x 80 mm verwendet (F 1).

3.1.3.2. Wärmeschrank
Hier wurde ein zeit- und temperatursteuerbarer Laborwärmeschrank mit Sturzzugbelüftung eingesetzt.

F 1: Schleicher & Schüle GmbH, 3354 Dassel

3.1.3.3. Autoklav

Das handelsübliche Gerät arbeitet mit einer Temperatur von 121°C, entsprechend einem Druck von 1 atü.

Für die Extraktionen im Wärmeschrank und Autoklaven wurden die Proben in 25 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und mit Aluminiumfolie abgedeckt.

3.1.4. Extraktionslösungen

Als Lösungsmittel für die Extraktionen wurden verwendet:

- 0,9 % physiologische Kochsalzlösung
- Leinöl
- 96 % Äthylalkohol, vergällt

3.1.5. Aufbereitung der Extrakte nach Anwendung von Äthylalkohol

Nach Extraktion im Soxhlet-Apparat und im Wärmeschrank wurde nach vollständigem Verdampfen des Restalkohols mit folgenden Lösungen aufbereitet:

- physiologische Kochsalzlösung nach Soxhlet-Anwendung
- Leinöl nach Wärmeschrankanwendung
- 0,5 % Na-Carboxymethylcellulose in Kochsalzlösung nach Soxhlet-Anwendung

Die so gewonnenen bzw. aufbereiteten Extraktionen wurden in sterile Einmalspritzen aufgezogen und innerhalb 24 Stunden im Tierversuch eingesetzt. Leerproben der Aufbereitungslösungen wurden ebenso für den Tierversuch vorbereitet.

3.2. Intradermaler Test nach Trypanblau-Methode

Nach erfolgter Rasur des Rückenhaars des Kaninchens von den Schulterblättern bis zum Becken in einer Breite von ca. 12 cm und Narkotisierung, wird jedem Tier an mindestens 2 Stellen des präparierten Rükkenareals im Abstand von 2,5 cm untereinander und von der Wirbelsäule entfernt, 0,2 ml der zu prüfenden Extraktionsprobe intradermal injiziert. Weiterhin wird jeweils an 2 Stellen 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung als negative Kontrolle, sowie die gleiche Menge und Anzahl 20% Äthylalkohols als positive Kontrolle injiziert. 15 Minuten nach der letzten Injektion wird dem Tier eine 1% Trypanblaulösung 1,0 ml/kg Körpergewicht (30) in die marginale Ohrvene injiziert.
Anschließend werden die Injektionsstellen des Prüfmaterials nach 30 Sekunden, 1, 5, 10, 15, 30. 45. 60 Minuten, sowie nach 24 Stunden beobachtet und auftretende Reaktionen bewertet.

3.2.1. Bewertung der Reaktion

Gewebsverletzungen, Irritationen oder Schädigungen im Bereich der intradermalen Injektionsstellen werden durch den Austritt der blauen Farbe erkannt. Trypanblau tritt aus den Gefäßen aus und färbt vorzugsweise die verletzten Regionen. Es zeigt je nach Grad der Schädigung eine unterschiedliche intensive Färbung, die wie folgt nach Stärke und Größe der Anfärbung zur Beurteilung der toxischen Reaktion nach KLÖTZER (18) benutzt wird.

0 -1 Keine, oder fragliche, oder nur sehr geringe Reaktion

2 mäßige Reaktion = deutliche Blaufärbung der ganzen Injektionsstelle

3 ischämisches Zentrum, umgeben von einem tiefblauen Rand. Diese Reaktion entspricht der Reaktion nach Injektion von 20 % Äthylalkohol. (Abbildung 1)

Die Kontrolle nach 24 Stunden dient dazu, verspätete Gewebsreaktonen zu beurteilen.

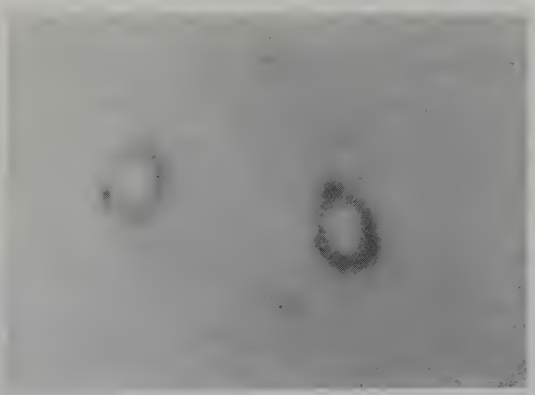


Abb. 1

3.3. Eigene Versuche

3.3.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 15 gesunde Albinokaninchen aus bäuerlicher Zucht verwendet. Ausgewählt wurden junge weibliche und männliche Tiere, mit einem Gewicht von 2,5 bis 3,0 kg.

3.3.2. Vorbereitung der Tiere

Das Rückenhaar der Kaninchen wurde von den Schulterblättern bis zum Becken in einer Breite von ca. 12 cm mit einer elektrischen Tierhaarschneidemaschine geschoren. Bei der Rasur der feinen Unterhaare wurde darauf geachtet, die Rückenhaut nicht zu verletzen.

Das rasierte Areal wurde mit einem feuchten Tuch von losen Haaren gereinigt und mit KODAN^{R}-Spray (F2) desinfiziert. Die Injektionssegmente wurden mit chirurgischer Tusche markiert.

3.3.3. Narkose

Die Anaesthesie der Tiere erfolgte in i.v.-Vollnarkose mit Nebutal-Na (F3), wobei 0,5 ml/kg Körpergewicht in die marginale Ohrvene mit einer Kanüle Nr. 18 injiziert wurde.

F 2: Schülke & Mayr GmbH, 2241 Norderstedt
F 3: Deutsche Abott GmbH, Ingelheim

Um einen vasalen Injektionsschmerz durch die Injektionslösung zu mindern, und um eine exakte Dosierung zu gewährleisten, wurde die benötigte Injektionsmenge mit isotonischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt.
Um die marginale Ohrvene gut erkennen und den Injektionsort desinfizieren zu können, wurden die Ohraußenseiten mit einer Enthaarungscreme (F4) behandelt. Nach ausreichender Reinigung mit Wasser wurde desinfiziert.

3.3.3.1. Kennzeichnung

Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere mit einer nummerierten Kennmarke in einem der Ohren versehen.

3.3.3.2. Versuchsort

Für die Durchführung der Versuche stand ein gut eingerichteter Operationsraum für tierexperimentelle Chirurgie zur Verfügung. (F5)

F 4: Veet, Reckitt GmbH, Elmshorn
F 5: Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Tübingen

3.4. Angewandte Extraktionsverfahren

3.4.1.0. Soxhlet-Apparatur. Der Kunststoff wurde in 60 ml 96 % Äthylalkohol über 24 Stunden extrahiert. Nach Verdampfen des Restalkohols wurde der verbliebene Rückstand mit 15 ml isotonischer Kochsalzlösung aufgewaschen und zur Injektion verwendet.

3.4.1.1. Soxhlet-Apparatur. Extraktion wie 3.4.1.0. Nach Verdampfen des Restalkoholes wurde der Rückstand mit 0,5 % Na-Carboxymethylcellulose in isotonischer Kochsalzlösung aufgewaschen und zur Injektion verwendet.

3.4.1.2. Soxhlet-Apparatur. Der Kunststoff wurde in 100 ml isotonischer Kochsalzlösung über 24 h extrahiert und direkt zur Injektion verwendet.

3.4.2.0. Autoklav. Kunststoffproben bei 121° C über 1 Stunde in isotonischer Kochsalzlösung extrahiert; die Lösung wurde direkt zur Injektion verwendet.

3.4.2.1. Autoklav. Bei 121° C über 1 Stunde mit Leinöl extrahiert; Lösung direkt injiziert.

3.4.3.0. Wärmeschrank. Bei 70 °C über 24 Stunden in isotonischer Kochsalzlösung extrahiert; die Lösung wurde unverändert injiziert.

3.4.3.1. Wärmeschrank. Bei 70 °C über 24 Stunden in Leinöl extrahiert und direkt zur Injektion verwendet.

3.4.4.0. Wärmeschrank. Kunststoffe bei 50 °C über 72 Stunden in isotonischer Kochsalzlösung extrahiert; Lösung direkt injiziert.

3.4.4.1. Wärmeschrank. Kunststoffe bei 50 °C über 72 Stunden in Leinöl extrahiert und direkt zur Injektion verwendet.

3.4.5.0. Wärmeschrank. Kunststoffe in 96 % Äthylalkohol bis zum vollständigen Verdampfen belassen. Der Rückstand wurde mit isotonischer Kochsalzlösung aufgewaschen und so aufbereitet zur Injektion verwendet.

3.4.5.1. Wärmeschrank. Kunststoffe in 96 % Äthylalkohol bis zum vollständigen Verdampfen belassen. Der Rückstand wurde mit Leinöl aufgewaschen und zur Injektion verwendet.

3.4.5.2. Wärmeschrank. Kunststoffe in physiologischer Kochsalzlösung bis zum Verdampfen belassen. Verbleibender Rückstand mit isotonischer Kochsalzlösung aufgewaschen und zur Injektion verwendet.

3.4.6.0. Destillationsanordnung. Kunststoffe in isotonischer Kochsalzlösung extrahiert. Nach 24 Stunden wurde das entstandene Destillat entnommen und zur Injektion verwendet.

3.5. Dokumentation der Versuche

3.5.1. Extraktionsverfahren

Über jedes Extraktionsverfahren wurde ein Protokoll geführt. (Abb. 2)
Die Kunststoffe wurden bei Erhalt mit einer Code-Nummer (s. 3.1.) versehen, um subjektive Bewertungen auszuschließen.

3.5.2. Intradermaler Test

Den Tierschutzgesetzen entsprechend wurde über jedes Tier und Versuch Buch geführt.
Der Ablauf der Versuche wurde für jedes Tier in einem Protokoll dokumentiert.(Abb. 3)

EXTRAKTIONSPROBEN

Versuchsprotokoll

Material KA-Nr.:

Code-Nr.: Datum der Herstellung:

Versuchsdauer:

Extraktionsgerät:

Verfahren:

Materialmenge: Lösungsmittel/Menge:

Aufbereitung/Menge:

Injektionsdatum:

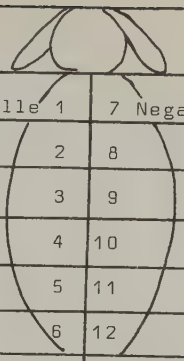
Tiere-Nr.:

Bemerkungen:

Abbildung 2: Versuchsprotokoll der Extraktionsproben

INTRADERMALER TEST IN KANINCHEN

L R



Tier-Nr.: KA-	Positive Kontrolle	1
Kennzeichen:		2
Gewicht:		3
Herkunft:		4
Anaesthesie: Menge:		5
Anaesthesie-Methode:		6
Datum d. Experiments:		
	7	Negative Kontrolle
	8	
	9	
	10	
	11	
	12	

Material Code-Nr.:	Inj. Zahl	Kontrollzeit (Min)/Reaktion 0,5	1	5	10	15	30	45	60	24 h	Bemerkungen
1 pos.Kontrolle											
2											
3											
4											
5											
6											
7 neg.Kontrolle											
8											
9											
10											
11											
12											

Abbildung 3: Versuchsprotokoll - Intradermale Injektionen

IV. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der intradermalen Injektionen

Code-Nr. des Materials	Inj.-Zahl	Reaktionen		
		0 - 1 fraglich	2 mäßig	3 stark
K 5	6	6	-	-
K 9	2	2	-	-
K 14	34	32	2	-
K 18	43	39	4	-
K 21	26	22	4	-
K 23	35	35	-	-
K 24	2	2	-	-
K 25	11	11	-	-
K 26	3	3	-	-
K 27	4	4	-	-
K 30	8	8	-	-
K tox	28	21	7	-
pos.Kontr.	30	-	-	30
neg.Kontr.	30	30	-	-
Leerproben	16	8	8	-

Tabelle 3. Reaktionen im intradermalen Test

4.2. Bewertung der Reaktion

Als Grundlage der Bewertung der Reaktionsintensität diente die Einteilung nach KLÖTZER (s. 3.2.1.).
Zur makroskopischen Bewertung einer auftretenden Reaktion wurde die Intensität der Reaktion der positiven Kontrolle als Vergleichswert herangezogen (Abb. 4).

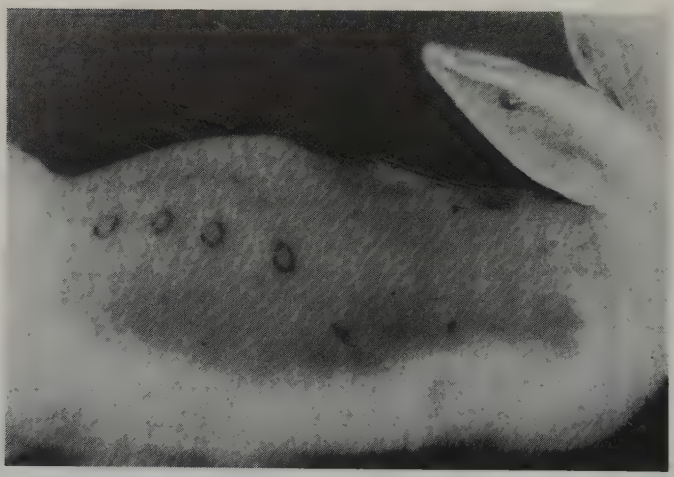


Abbildung 4: Reaktionen der Stärke 3 nach Injektion von 20 % Äthylalkohol als positive Kontrolle

4.2.1. Fragliche Reaktion (0 - 1)

Bei den angeführten fraglichen Reaktionen der Tabelle 3 handelt es sich um keine oder nur sehr geringe Reaktionen. Bei den Materialien K 5 und K 23 traten sehr geringe Reaktionen nach 24 Stunden auf.

4.2.2. Mäßige Reaktion (2)

Die Reaktionen der Materialien K14, K 18 und eine des Probematerials K tox sind nach Injektionen des Destillates nach Verfahren 3.4.6.0. aufgetreten, bei dem isotonische Kochsalzlösung als Extraktionslösung verwendet wurde.
Die Leerproben nach diesem Verfahren zeigten ebenso Reaktionen der Stärke 2. Somit sind diese Reaktionen als Ergebnis nicht verwertbar.

Die Reaktionen des Materials K 21 der Stärke 2 konnten in einem Nachfolgeversuch nicht bestätigt werden.
Bei zwei Versuchstieren konnten Reaktionen nach Injektion des Extraktes vom Probematerial K tox nach Verfahren 3.4.1.0. festgestellt werden.
Alle durchgeführten Injektionen zeigten nach 10 - 15 Minuten Reaktionen der Stärke 2.

4.2.3. Starke Reaktion (3)

Bei keinem Versuchsmaterial konnte diese Reaktionsintensität festgestellt werden.
Auch durch das toxische Probematerial K tox wurde keine Reaktion dieser Stärke beobachtet.

4.2.4. Positive und negative Kontrolle

Die positive Kontrolle mit 20 % Äthylalkohol löste nach 1 Minute die Reaktion der Stärke 0 - 1 aus, die sich nach 5 - 10 Minuten zur Reaktion der Stärke 3 ausbildete.
Die negative Kontrolle mit 0,9 % physiologischer Kochsalzlösung blieb nach allen Injektionen reaktionslos.

4.2.5. Leerproben

Leinöl und 0,5 % Na-Carboxymethylcellulose in isotonischer Kochsalzlösung blieben reaktionslos.
Die Leerproben mit dem Destillat nach Verfahren 3.4.6.0. zeigten Reaktionen der Stärke 2.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Durch die Zunahme der Verarbeitung von zahnärztlichen Kunststoffen in der restaurativen und prothetischen Zahnheilkunde, ist die biologische Materialrüfung derjenigen Werkstoffe, die mit lebendem Gewebe in Kontakt gebracht werden, grundsätzlich erforderlich.
Die biologische Materialprüfung soll den Patienten vor möglichen Schädigungen bewahren, die durch nicht erkannte toxische Bestandteile hervorgerufen werden könnten.
Mit Hilfe des intradermalen Tests bei Kaninchen sollen solche Substanzen eliminiert werden, die Gewebsreaktionen auslösen. Er wird somit als grober Eliminationstest für flüssige Substanzen, oder für feste Stoffe aus denen sich Lösungen oder Extrakte herstellen lassen, verwendet.
Auch bei diesem Verfahren gilt es, die zahlreichen Variablen zu berücksichtigen, die alle biologischen Prüfverfahren beinhalten, da es nicht möglich ist, jeden Tierversuch unter den genau gleichen Bedingungen durchzuführen.
Die Toxizitätsbestimmung ist durch dieses Verfahren mit relativ geringem Aufwand möglich und in entsprechend ausgestatteten Laboratorien durchführbar.

5.1. Extraktionsverfahren

Um eine mögliche Auslaugbarkeit zu prüfen, wurden Alkohol, physiologische Kochsalzlösung und Leinöl als Lösungsmittel verwendet. Wobei schon GUESS et al. (10) auf das aggressive Medium Alkohol hinwies, das über ein eigenes toxisches Potential verfügt. Durch das notwendige Verdampfen des Restalkohols, ist eine eventuelle Verflüchtigung ausgelöster Bestandteile des Eluats nicht ausgeschlossen.
Deshalb sollten verfahrensbedingt, nur Salzlösungen oder pflanzliche Öle als Extraktionsmittel Verwendung finden.

Bei der Extraktion im Wärmeschrank mit isotonischer Kochsalzlösung des Prüfmaterials K tox, sowie im Autoklaven mit Leinöl bei den Materialien K 14, K 18 und K tox sind Verfärbungen der Lösungen aufgetreten.
Die Prüfmaterialien waren gebleicht.
Gewebsreaktionen sind nach Injektion dieser Lösungen nicht aufgetreten, obwohl die Verfärbung der Extraktionslösungen auf eine Änderung der chemischen Zusammensetzung der Lösungen schliessen läßt.
Die Versuchsanordnung nach 3.4.6.0. erbrachte

sowohl als Leerprobe, wie auch als Extraktion Reaktionen der Stärke 2 hervor, die durch die Hypertonie der entstandenen Kochsalzlösungen bedingt worden waren. Diese Versuchsanordnung erwies sich hiernach als unbrauchbar.

5.2. Versuchstiere und Vorbereitung zum Test

Kaninchen sind weniger infektionsgefährdet als andere infrage kommenden Versuchstiere, deshalb werden sie am häufigsten zu Eliminationstests herangezogen.
Es wurden ca. 6 Monate alte Albinokaninchen mit einem Gewicht zwischen 2,5 kg und 3,0 kg verwendet, weil deren Körpergröße ein ausreichend großes Rückenareal für Injektionsreihen bietet. Es wurden durchschnittlich 24 Injektionen bei jedem Tier durchgeführt.
Es ist darauf zu achten, daß die Versuchstiere keine Verletzungen am Rücken aufweisen, bzw. daß bei der Rasur der feinen Rückenhaare der Tiere die Rückenhaut nicht verletzt wird, da durch die Färbung der verletzten Region durch Trypanblau eine Bewertung der Injektionsquaddeln erschwert sein kann.

Die Anaesthesie wurde mit dem Barbiturat-Präparat Nembutal-Na (F 3) durchgeführt. Die Tiere waren gut relaxiert und anästhesiert.

5.3. Intradermaler Test

Der Test wurde, wie unter 3.2. beschrieben, durchgeführt. Bei Injektionen von Leinöl-Lösungen wurde eine, nach dem Einstich rechtwinklig abgeschwenkte Injektionstechnik angewendet, die verhindern sollte, daß durch die Gewebsspannung die ölige Substanz wieder aus der Quaddel herausläuft.
Bei den, nach 24 Stunden festgestellten fraglichen Reaktionen, ist eine mechanische Läsion durch die Injektion als Ursach nicht auszuschließen.

5.4. Eignung des Testverfahrens zur Prüfung zahnärztlicher Materialien

Die Ergebnisse zeigen, daß nur bei einem Prüfmaterial im intradermalen Test bewertbare Reaktionen aufgetreten sind, die auf eine Gewebsirritation durch toxische Substanzen schließen lassen.
Die teilweise aufgetretenen Verfärbungen der Extraktionsproben beinhalten eine Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Lösungen. Reaktionen sind aber dadurch nicht aufgetreten. Es ist daher zu fragen, ob das eventuell entstandene toxische Potential dieser Lösungen

zu gering oder diese Testmethode nicht empfindlich genug für diesen Anwendungsbereich ist.

Die in der Literatur beschriebenen, zufriedenstellenden Ergebnisse mit diesem Testverfahren konnten nicht erreicht werden.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die in der Literatur angeführten Ergebnisse nicht mit Extraktionen zahnärztlicher Kunststoffe erzielt wurden, sondern mit wesentlich toxischeren Industriekunststoffen.

Für die Ermittlung der primären Irritation durch flüssige Substanzen erscheint dieses Testverfahren bedingt geeignet.

Es wird auf Grund dieser Arbeit geraten, die untersuchte Prüfmethode im Rahmen einer Spezifikation zur Prüfung der biologischen Eigenschaften zahnärztlicher Materialien nicht zu verwenden, da der vergleichsweise hohe experimentelle Aufwand in keinem vertretbaren Verhältnis zur Aussage und zur Sicherheit des erzielten Ergebnisses stehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, ob der intradermale Test in Kaninchen, der sich zur Ermittlung der primären Irritation flüssiger Substanzen oder fester Stoffe, sofern sich davon Lösungen oder Extrakte herstellen lassen, eignet, aussagefähige Ergebnisse im Rahmen der akuten lokalen Toxizitätsprüfung zahnärztlicher Materialien zu erbringen.
Es wurden Extraktionen aus zahnärztlichen Kunststoffen und einem bekannt toxischen Prüfmaterial hergestellt, die den Versuchstieren an mindestens zwei Stellen intradermal in die Rückenhaut injiziert wurden. Zur Bewertung der akuten Reaktion wurde die Trypanblau-Methode angewandt.
Die Extraktionen wurden mit dem Soxhlet-Apparat, dem Wärmeschrank, dem Autoklaven und einer Destillationsanordnung durchgeführt. Als Extraktionslösungen wurden Alkohol, Leinöl und physiologische Kochsalzlösung verwendet.
Die geprüften Materialien zeigten bis auf den toxischen Prüfkunststoff keine Gewebsreaktionen.

Für die grobe Ermittlung (screening test) der akuten lokalen Toxizität flüssiger Substanzen zahnärztlicher Werkstoffe erscheint diese Test-

methode als Vorprüfung bedingt geeignet.

Die Aufnahme dieser Methode in die Prüfnormen zur Bestimmung der biologischen Eigenschaften zahnärztlicher Kunststoffe scheint aufgrund der vorliegenden Untersuchung nicht gerechtfertigt.

SUMMARY

Purpose of this investigation was to find out wether the intradermal testing of dental materials in Albino rabbits is suited for local, toxicity screening of dental materials.

Extracts of dental plastics as well as of a sample of known toxicity were produced and injected in at least two sites on the back of Albino rabbits.

For to evaluate the acute reaction, the Trypan-blue-method was employed.

The extracts were produced either by the Soxhlet-apparatus, an oven, the autoclave or/and a destillation-apparatus.

As extracting solutions 20% ethyl alcohol, flax oil and normal saline solution was used.

Of the tested materials three produced a moderate toxic response.

The method was found to be conditional suited as a preliminary, screening test procedure for the determination of the acute, local toxicity of liquids or liquid extracts of dental materials.

For a routine and standardized test method, the intradermal test in rabbits should not be recommended.

LITERATURVERZEICHNIS

1 AMERICAN DENTAL ASSOCIATION — "Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials." J.Amer.dent.Ass.84

2 AUTIAN, J. — "Development of standards for plastics to be used in pharmacy and medicine." J.dent.Res. 45, 1668-1674 (1966)

3 AUTIAN, J. — "Toxicolgic aspects of implants." J.biomed.Mater.Res. 1, 433-449 (1967)

4 AUTIAN, J. — "The New Field of Plastics Toxicology-Methods and Results." CRC - Critical Reviews in Toxicology 2, 1-40 (1973)

5 BORNMANN, G. und A. LOESER — "Monomer-Poymer." Studie über Kunststoffe aus ε-Caprolactam oder Bisphenol Arzneim.-Forsch.(Drug.Res.) 9, 9-13 (1959)

6 HARNDT, R. — "Biologische Testmethoden." Dtsch. zahnärztl.Z. 26, 316-326 (1971)

7 HERRMANN, H.W. — "Zur Prüfung des gewebsbiologischen Verhaltens zahnärztlicher Kunststoffe." Zahnärztl.Rdsch. 67, 463-466 (1958)

8 HOPPE, W. — "Tierexperimentelle Untersuchungen über Gewebsreaktionen auf Injektionen von autopolymerisierendem Kunststoff."

9 GÖTTE, H. — "Zur Stoffschädigung durch Kunststoffprothesen." Zahnärztl.Praxis 15, 64-65 (1964)

10 GUESS, W.L. and S. HABERMAN — "Toxicity profiles of vinyl and polyolefinic plastics and their additives." J.biomed.Mater.Res. 2, 313-335 (1968)

11 KAWAHURA, H., YAMAGAMI, A. and M. NAHAMURA — "Biological Testing of Dental Materials by Means of Tissue Culture." Int.dent.J. 18, 443-467 (1968)

12 KLÖTZER, W.T. — "Tierexperimentelle Prüfung von Materialien und Methoden der Kronen- und Brückenprothetik." Habilitationsschrift, Tübingen 1971

13 KLÖTZER, W.T. — "Gefährdung des Zahntechnikers durch Materialien." Dent.Labor 21, 714-717 (1973)

14 KLÖTZER, W.T. "Biologische Prüfung zahnärztlicher Materialien. 1.Teil. Bedürfnis,Grundlagen und Programm." Vortragsmanuskript 1-25 (1973)

15 KLÖTZER, W.T. "Die Reaktion der Gingiva im Kontakt mit zahnärztlichen Materialien." Dtsch.zahnärztl.Z. 28, 1181-1191 (1973)

16 KLÖTZER, W.T. "Tagungsbericht: Biologische Reaktionen der lebenden Gewebe auf zahnärztliche Kunststoffe." Zahnärztl.Rdsch. 83,1215 (1974)

17 KLÖTZER, W.T. "Biologische Prüfung von Füllungswerkstoffen und Befestigungszementen." Mschr.Dtsch.Zahnärzte 18,321-326(1974)

18 KLÖTZER, W.T. "Prüfung der biologischen Reaktion der lebenden Gewebe auf zahnärztliche Kunststoffe." Dtsch.zahnärztl.Z. 30, 126-131 (1975)

19 KUCK, M. "Reizungen der Mundschleimhaut durch Farbzusätze der Prothesenwerkstoffe." Dtsch.zahnärztl.Z. 11,678-686 (1956)

20 LANGELAND, K. "Biologische Prüfverfahren zur Beurteilung zahnärztlicher Materialien." Dtsch.zahnärztl.Z. 20,1291-1299(1965)

21 LANGELAND, K. "Toxicity Testing of Dental Material." Tagungskonzept Jahrestagung FDI/ISO, London (1974)

22 LANGELAND, K.und W.T. KLÖTZER "Verfahren zur Prüfung der biologischen Eigenschaften zahnärztlicher Werkstoffe" Dtsch.zahnärztl.Z. 26, 298-315 (1971)

23 LAWRENCE, W.H., M.MALIK and J.AUTIAN "Development of a Toxicity Evaluation Program for Dental Materials and Products. II.Screening for Systemic Toxicity." J.biomed.Mater Res.8, 11-34 (1974)

24 LAWRENCE, W.H., J.L. MITSCHELL, W.L. GUESS and J. AUTIAN "Toxicity of Plastics Used in Medical Practice. I.Investigation of Tissue Response in Animals by Certain Unit Packaged Polyvinyl Chloride Administration Devices." J.Pharm.Sci. 52, 958-962 (1963)

25 LEFAUX, R. "Chemie und Toxikologie der Kunststoffe." Krauskopf-Verlag, München (1966)

26 MAGNUSSON, B.and A.M. KLIGMAN "The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test." J.invest.Dermatol. 52, 268 ff (1969)

27 MEYERS, E.L. "The Fud and Drug Administration Role in the Use of Plastic Materials." J.dent.Res. 45, 1675-1682 (1966)

28 MITSCHELL, D.F., SHANKWALKER, G.B. and S. SHAZER "Determining the Tumorgenicity of Dental Materials." J.dent.Res. 39, 1023-1028 (1960)

29 POWELL, D., W.H. LAWRENCE, J. TURNER and J. AUTIAN "Development of a Toxicity Evaluation Program for Dental Materials and Products. I.Screening for Irritant Responses." J.biomed. Mater.Res. 4, 583-596 (1970)

30 ROMEIS, B. "Mikroskopische Technik." Oldenburg Verlag, München-Wien, 16. Aufl., (1968)

31 SMITH, D.C. "Biological Properties of Dental Materials." Dent.Practit. 20,81-86 (1969)

32 THE PHARMACOPEIA OF THE UNITED STATES OF AMERICA "XVIII -Biological Tests - Plastic Containers." Mack Publishing Co., Easton,Pa., 920-929 (1970)

33 TURNER, J.E., W.H. LAWRENCE and J. AUTIAN "Subacute Toxicity Testing of Biomaterials Using Histopathologic Evaluation of Rabbit Muscle Tissue." J.biomed.Mater.Res. 7, 39-58 (1973)

34 VIOHL, J. "Labortestmethoden und FDI-Spezifikationen." Dtsch.zahnärztl.Z. 26, 290-297 (1971)

35 WAERHAUG, J.and H.A. ZANDER "Reaction of gingival tissue to self-curing acrylic restorations." J.Amer.dent.Ass. 54, 760-768 (1957)

DANKADRESSE

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Ratschläge bei dessen Bearbeitung danke ich Herrn Professor Dr. Dr. W.T. Klötzer herzlich.
Meinem Kollegen Herrn Dr. med. dent. Kurt Vogel möchte ich für seine Assistenz bei der Durchführung der Versuche danken.

L E B E N S L A U F

Am 23. Mai 1946	wurde ich, Wolf Otto Unger als Sohn des Metzgers Hans-Günter Unger und seiner Ehefrau Sophie, geb. Auernhammer, in Solnhofen/Mfr. geboren.
1952 -1956	Besuch der Volksschule Neustadt b. Coburg
1956 -1959	Oberrealschule Neustadt/Coburg
1959 -1960	Staatliches Gymnasium in Hechingen
1960 -1961	Kepler-Gymnasium in Reutlingen
1961 -1966	Theodor-Heuss-Schule in Reutlingen
11.10. 1966	Abitur
1966 - 1970	Dienst in der Bundeswehr
seit WS 1970	Studium der Zahnmedizin an der Universität Tübingen
1971	Vorphysikum
1973	Physikum
am 16.12.1975	Staatsexamen
seit Januar 1976	bin ich als Assistent in einer zahnärztlichen Praxis in Urach tätig